

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

08.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年12月 8日
Date of Application:

出願番号 特願2003-409692
Application Number:

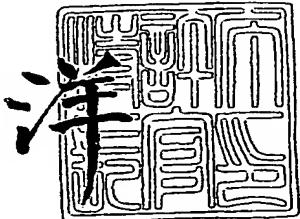
[ST. 10/C]: [JP2003-409692]

出願人 明治製菓株式会社
Applicant(s):

2005年 1月 20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 PM1776
【提出日】 平成15年12月 8日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市柏山788 明治製菓株式会社 微生物資源研究所内
【氏名】 渡辺 学
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市柏山788 明治製菓株式会社 微生物資源研究所内
【氏名】 矢内 耕二
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市柏山788 明治製菓株式会社 微生物資源研究所内
【氏名】 露木 由美子
【特許出願人】
【識別番号】 000006091
【氏名又は名称】 明治製菓株式会社
【代表者】 佐藤 尚忠
【電話番号】 03-3273-3357
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 008305
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項1】**

エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質の成熟タンパク質のN末端に、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加し、界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質に変換する方法。

【請求項2】

エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質が、ファミリー45に属するセルラーゼからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質の成熟タンパク質のN末端に、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドが付加され、界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項4】

請求項1又は2の方法によって得られ得る、請求項3に記載のタンパク質。

【請求項5】

下記からなる群より選択される、タンパク質：

(a) 配列番号2又は配列番号4、で表わされるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質、

(b) 前記(a)のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含んでなり、かつ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有する改変タンパク質。

【請求項6】

請求項3～5のいずれか一項に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項7】

下記からなる群より選択される、ポリヌクレオチド：

(i) 配列番号1又は配列番号3で表わされる塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド

(ii) 前記(i)の塩基配列において、1個又は複数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列を含んでなり、かつ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項8】

請求項6又7のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含んでなる、発現ベクター。

【請求項9】

請求項8に記載の発現ベクターにより形質転換された、宿主細胞。

【請求項10】

宿主が、酵母又は糸状菌である、請求項9に記載の宿主細胞。

【請求項11】

糸状菌が、フミコーラ属、トリコデルマ属に属するものである、請求項10に記載の宿主細胞。

【請求項12】

糸状菌が、フミコーラ・インソレンス又はトリコデルマ・ビリデである、請求項11に記載の宿主細胞。

【請求項13】

請求項9～12のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養する工程、および該培養によつて得られる宿主細胞もしくはその培養物から請求項3～5のいずれか一項に記載のタンパク質を採取する工程を含んでなる、タンパク質の製造方法。

【請求項14】

請求項13に記載の製造方法で生産されたタンパク質。

【書類名】明細書

【発明の名称】エンドグルカナーゼ活性を有するセルラーゼを界面活性剤存在下で活性の低下が少ないセルラーゼに変換する方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、ファミリー45に属するエンドグルカナーゼ活性を有するセルラーゼのN末端側に、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加し、界面活性剤存在下でエンドグルカナーゼ活性の低下が少ないセルラーゼに変換する方法およびそのセルラーゼに関する。

【背景技術】

【0002】

セルロース系バイオマスは天然に最も多く存在する資源であるといわれている。よってこれを分解するセルラーゼ系を効率良く利用することは様々な分野で囁きされている。この過程で、様々なセルラーゼが精製され、その特性が解明されてきた。更に、様々なセルラーゼがクローニングされ、その配列の相同性を解析し、ファミリー分類がなされるまでに到っている（非特許文献1参照）。

一方、セルラーゼはその特性を活かしてさまざまな産業分野で利用されているが、纖維加工分野での利用は重要である。例えば、セルロース含有纖維の肌ざわりおよび／又は外観を改善するため、または着色されたセルロース含有纖維に色の局所的な変化を提供する「ストーンウォッシュ」様外観を与える「バイオウォッシュ」のためにセルラーゼが使用されている。また、近年その強度や吸水性等の性質、更には環境汚染を起こしにくい製造法から注目を集めている木材パルプ由来の再生セルロース系纖維であるリヨセルを、製造工程で発生する織物表面の毛羽を除く加工にセルラーゼが用いられている。

【0003】

これまで、セルラーゼは複数の酵素の共同作用、即ちシナジー効果によりセルロースを分解するとてきた。この複合酵素系のセルラーゼ群には、纖維強度を低下させるなど纖維加工分野では好ましくない性質を有する酵素系も含まれる。そこで、タンパク質分離技術や遺伝子工学的手法を用いて、これらセルラーゼ群から、纖維加工に適した酵素成分を分離し製造する試みがなされている。とりわけ、糸状菌のトリコデルマ (Trichoderma) 属、フミコーラ (Humicola) 属由来のセルラーゼについては研究が進み、フミコーラ属では、CBH I、EG V (特許文献1参照)、NCE 2、NCE 4、NCE 5などが、トリコデルマ属では、CBH I、CBH II、EG II、EG IIIなどの成分が単離され、遺伝子操作によって過剰発現酵素やモノコンポーネント酵素などを調製することにより、各用途に適した特定セルラーゼ成分を多量に含むセルラーゼ調製物が製造されるようになってきた。更に、NCE 4 (特許文献2参照)、NCE 5 (特許文献3参照)、RCE 1 (特許文献4参照)、STCE 1 (特許文献5参照)などファミリー45に属するセルラーゼが上述した分野において非常に有用であることも明らかとなっている。

【0004】

一方、セルラーゼを衣料用洗浄剤用途に用いる場合には、必要なセルラーゼ成分を量的に改善するだけでなく質的に改善することが望まれている。即ち、衣料用洗浄剤には各種界面活性剤が配合されているとともに、これを水に溶解した場合アルカリ性 (pH 10 ~ 11) を示すことから、衣料用洗浄剤に配合されるセルラーゼの性質としてアルカリ条件下で各種界面活性剤に対して耐性を示すことが求められている。これまで、界面活性剤存在下での活性低下を抑制する例としては、Otzen, D. E. らは、フミコーラ・インソレンス (Humicola insolens) 由来 Cel 45 の内部アミノ酸配列に変異を導入し、pH 7 の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) 存在下での活性が約 3~3 倍に向上していると報告している（非特許文献2参照）。しかしながら、本変異により付与される界面活性剤存在下での活性低下の抑制は、Cel 45 またはその相同体に限定され、Cel 45 と相同性の低いファミリー45に属するエンドグルカナーゼには適

用できないことが明らかとなっている。

【0005】

【特許文献1】国際公開第91/17243号パンフレット

【特許文献2】国際公開第98/03667号パンフレット

【特許文献3】国際公開第01/90375号パンフレット

【特許文献4】国際公開第00/24879号パンフレット

【特許文献5】特願2003-404020号明細書

【非特許文献1】Henrissat B., Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochem. J. 316:695-696 (1996)

【非特許文献2】Daniel E. Otzen, Lars Christiansen, Martin Schulein. A comparative study of the unfolding of the endoglucanase Cel45 from Humicola insolens in denaturant and surfactant. Protein Sci. 8:1878-1887 (1999)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、ファミリー45に属するエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質を界面活性剤存在下で活性低下の少ないタンパク質に変換する方法、その方法に使用するベクター、界面活性剤存在下で活性の低下が少ないファミリー45に属するエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質、それをコードするポリヌクレオチド等の提供を目的としている。更に、それらを用いることにより、衣料用洗浄用酵素として利用することのできるタンパク質を効率よく生産する微生物の提供を目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を行った。その結果、ファミリー45に属するエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質のN末端側にピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加したタンパク質、すなわちN末端付加型セルラーゼが、その天然型セルラーゼと比較し、界面活性剤存在下でエンドグルカナーゼ活性が明らかに低下しないことを見出した。

【0008】

アニオン系界面活性剤存在下で高いエンドグルカナーゼ活性が保持されるという性質は、衣料用洗浄用酵素として特に有用であり、このようなセルラーゼに関する知見は今までに全くなかった。また、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加することによって、界面活性剤存在下で、酵素に本来備わる機能の低下を防ぐことが可能であるとの知見もこれまでに報告されていなかった。

【0009】

本発明の別の態様としては、界面活性剤存在下で活性を低下させたくない全てのN末端アミノ基が保護されていないセルラーゼに、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加することにより、界面活性剤存在下での活性の低下を抑制することが可能となる。ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加できるセルラーゼは特に限定されることはなく、例えばファミリー45に属するエンドグルカナーゼが好ましい。

【0010】

従って、本発明は、以下の発明を包含する。

(1) エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質の成熟タンパク質のN末端に、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加し、界面活性剤存在下で活性低下

の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質に変換する方法。

(2) エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質が、ファミリー45に属するセルラーゼからなる群より選択される、前記(1)に記載の方法。

(3) エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質の成熟タンパク質のN末端に、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドが付加され、界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質。

(4) 前記(1)又は(2)の方法によって得られ得る、前記(3)に記載のタンパク質。

(5) 下記からなる群より選択される、タンパク質：

(a) 配列番号2又は配列番号4、で表わされるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質、

(b) 前記(a)のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含んでなり、かつ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有する改変タンパク質。

(6) 前記(3)～(5)のいずれか一つに記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(7) 下記からなる群より選択される、ポリヌクレオチド：

(i) 配列番号1又は配列番号3で表わされる塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド

(ii) 前記(i)の塩基配列において、1個又は複数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列を含んでなり、かつ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(8) 前記(6)又(7)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドを含んでなる、発現ベクター。

(9) 前記(8)に記載の発現ベクターにより形質転換された、宿主細胞。

(10) 宿主が、酵母又は糸状菌である、前記(9)に記載の宿主細胞。

(11) 糸状菌が、フミコーラ属、トリコデルマ属に属するものである、前記(10)に記載の宿主細胞。

(12) 糸状菌が、フミコーラ・インソレンス又はトリコデルマ・ビリデである、前記(11)に記載の宿主細胞。

(13) 前記(9)～(12)のいずれか一つに記載の宿主細胞を培養する工程、および該培養によって得られる宿主細胞もしくはその培養物から前記(3)～(5)のいずれか一つに記載のタンパク質を採取する工程を含んでなる、タンパク質の製造方法。

(14) 前記(13)に記載の製造方法で生産されたタンパク質。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、衣料用洗浄用酵素として利用することのできる従来にない界面活性剤存在下でのエンドグルカナーゼ活性の低下が少ないセルラーゼを効率よく生産することが可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

ファミリー45に属するエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質（以下、単に「ファミリー45に属するセルラーゼ」と略記することもある）

ファミリー45

本発明における「ファミリー45」とは、Henri sat B. らによる糖質活性化酵素(Carbohydrate activating enzyme)の疎水性クラスター解析(Hydrophobic cluster analysis)によりファミリー45に分類されたものをいう(Henri sat B., Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochem. J

316:695-696 (1996) .)。

【0013】

エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質

本発明における「エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質」とは、エンドグルカナーゼ活性を示す酵素、すなわちエンドー-1, 4- β -グルカナーゼ (EC 3. 2. 1. 4) を意味し、該酵素は、 β -1, 4-グルカンの β -1, 4-グルコピラノシリル結合を加水分解する。

【0014】

界面活性剤

本発明における「界面活性剤」とは、衣料用洗浄剤に配合される洗浄成分であり、アニオン系、カチオン系およびノニオン系界面活性剤に大別されるが、アニオン系界面活性剤が主に用いられている。本発明の好適な例としては、アニオン系界面活性剤として直鎖アルキルベンゼンスルホン酸（以下、単に「LAS」と略記することもある）を挙げることができる。

【0015】

エンドグルカナーゼ (EGU) 活性

本発明における「エンドグルカナーゼ（以下、単に「EGU」と略記することもある）活性」とは、カルボキシメチルセルロース溶液の粘度低下を測定し、これを酵素活性として定量したものであり、実験の詳細は以下の通りである。

基質溶液として、カルボキシメチルセルロース（Hercules社製）を終濃度3.5%となるように、0.1mol/Lトリス塩酸緩衝液(pH10.0)に溶解した。この基質溶液5mlを40℃で10分間予め加温し、これに酵素溶液0.15mlを加え、良く攪拌し、40℃で30分間反応させた。この反応液を、40℃に設定しておいたR型粘度計（東機産業RE100）で粘度を測定した。酵素活性は、各反応条件下において、初期粘度を1/2に低下させる酵素量を1単位とした。アニオン系界面活性剤は、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸（和光純薬製）を用い、終濃度800ppmとなるようカルボキシメチルセルロース溶液に添加した。

【0016】

界面活性剤存在下でのエンドグルカナーゼ活性の低下の抑制

本発明による「界面活性剤存在下での活性の低下が少ない」とは、本発明のタンパク質（N末端付加型）をそのN末端アミノ酸付加前のもの（天然型）と、界面活性剤存在下におけるエンドグルカナーゼ活性を指標に比較した結果、エンドグルカナーゼ活性が天然型に比べN末端付加型の方が高いことを意味する。

【0017】

ファミリー45に属するセルラーゼの由来

このファミリー45に属するセルラーゼは、慣用とされる遺伝子工学的手法、例えば組換えDNA技術、ポリペプチド合成技術などによって作製することができるほか、天然から分離された菌株から取得することもできる。さらに、天然から得られるファミリー45に属するセルラーゼの変異体も含めることができる。

ファミリー45に属するセルラーゼは、例えば糸状菌類、接合菌類などの微生物から得ることができる。糸状菌類としては、例えばフミコーラ属（例えば、フミコーラ・インソレンス）、トリコデルマ属（例えば、*Trichoderma viride*）、スタフィロトリクム属（*Staphylococcus viride*）（例えば、スタフィロトリクム・コスコラム（*Staphylococcus coccophorum*））、ミリオコッカム属（例えば、ミリオコッカム・サーモフィラム（*Mycococcum thermophilum*））に属する微生物から得ることができる。具体的には、フミコーラ属由来のセルラーゼとしては、CBH I、EG V、NCE2、NCE4、NCE5などが、トリコデルマ属由来のセルラーゼとしては、CBH I、CBH II、EG I、EG IIIなどが、スタフィロトリクム属由来のセルラーゼとしてはSTCE1、STCE3などが、ミリオコッカム属由来のセルラーゼとしてはMTE1などが挙げられ

る。接合菌類としては、例えばリゾpus属 (Rhizopus) (例えば、リゾpus・オリゼー (Rhizopus oryzae))、ムコール属 (Mucor) (例えば、ムコール・サーシネロイデス (Mucor circinelloides))、ファイコマイセス属 (Phycomyces) (例えば、ファイコマイセス・ニテンス (Phycomyces nitens)) に属する微生物から得ることができる。具体的には、リゾpus・オリゼー由来のRCE I、RCE II、RCE III、ムコール・サーシネロイデス由来のMCE I、MCE IIとファイコマイセス・ニテンス由来のPCE Iがある(国際公開第00/24879号パンフレット)。

【0018】

ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチド

本発明において「ピログルタミン酸」とは成熟タンパク質のN末端グルタミンまたはグルタミン酸が環化され、ピログルタミン酸となったものを意味する。このピログルタミン酸は、N末端側アミノ基を提示しないことが特徴であり、in vivo、in vitroどちらでもピログルタミン酸化が可能である。in vivoにおいては成熟N末端がグルタミンまたはグルタミン酸になるよう成熟タンパク質を、遺伝子工学的手法を用いてデザインした成熟タンパク質をコードしたポリヌクレオチドを宿主内で発現させてデザインした成熟タンパク質が取得され、in vitroにおいては蟻酸などによりピログルタミン酸化タンパク質が取得される。また、in vitroにおいては蟻酸などの酸性溶液を用いてN末端にグルタミンまたはグルタミン酸を有するタンパク質を処理する事によりピログルタミン酸化タンパク質が取得できる。

【0019】

本発明において「ペプチド」とは、1ないしは複数個のアミノ酸からなる、ペプチド結合により重合したアミノ酸群を意味する。従って、本発明において「ピログルタミン酸を含むペプチド」とは、成熟タンパク質のN末端側に、ピログルタミン酸をN末端アミノ酸とするペプチドが結合されているものを意味する。ピログルタミン酸を含むペプチドは、2～複数個のアミノ酸からなり、例えば2～40個、好ましくは2～30個、より好ましくは2～20個、さらに好ましくは2～10個、特に好ましくは2～5個、さらに特に好ましくは2～4個のアミノ酸配列が架橋されているものである。ここでいうアミノ酸は当業者が使用できるものであれば、特に限定されるものではない。

【0020】

ファミリー45に属するセルラーゼのN末端側に、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加する方法

ファミリー45に属するセルラーゼのN末端側に、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加する方法は、遺伝子工学的手法を用いることにより得ることができる。一般的なセルラーゼの生産法としては、例えば糸状菌を用いて、目的とするセルラーゼをコードするポリヌクレオチドの翻訳領域を宿主で機能するプロモーターおよびターミネーターの間に正しく連結し、この発現カセットを宿主に導入することによりなし得る。更に、宿主細胞で機能する分泌シグナル配列をコードするポリヌクレオチドを付加し、宿主細胞に導入すると培地中に分泌され、目的とするセルラーゼを容易に回収することができる。このとき、分泌シグナル配列の直下に付加したいアミノ酸をコードするポリヌクレオチドを付加することによりセルラーゼのN末端側へ所望のアミノ酸を付加することができる。更に、N末端アミノ酸のアミノ基の修飾は、宿主の分泌シグナル配列を用いれば良く、例えばトリコデルマ・ビリデ由来のc b h 1やc b h 2、フミコーラ・インソレンス由来のNCE 2やNCE 5はN末端がピログルタミン酸化しているので、これらの分泌シグナル配列を用いて、それぞれトリコデルマ・ビリデやフミコーラ・インソレンスを用いて発現させることにより調製できる。本発明の好ましい態様によれば、以上のように調製されたファミリー45に属するセルラーゼは、界面活性剤存在下で活性の低下が少ないという有利な性質を有している。

【0021】

また、別の態様によれば、当業者が実施可能な程度の範囲内で、全合成することによって得ることもできる。この場合、天然由来のものの一部を利用して合成を行ったものであ

ってもよい。

【0022】

本発明のタンパク質

本発明のタンパク質とは、ファミリー45に属するセルラーゼを取得し、その成熟タンパク質のN末端アミノ酸側に、ピログルタミン酸(pQ)又はピログルタミン酸を含むペプチドを附加したものであって、界面活性剤存在下でエンドグルカナーゼ活性の低下が少ないものである。また、前述の方法によって得られ得る、界面活性剤存在下で活性の低下が少ないエンドグルカナーゼ活性を有する、タンパク質である。

【0023】

例えば、下記からなる群より選択される、タンパク質：

(a) 配列番号2又は配列番号4、で表わされるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質、

(b) 前記(a)のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は附加されたアミノ酸配列を含んでなり、かつ界面活性剤存在下で活性の低下が少ないエンドグルカナーゼ活性を有する改変タンパク質。

【0024】

本発明における「改変タンパク質」とは、配列番号2又は配列番号4のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は附加されたアミノ酸配列を含んでなり、かつ界面活性剤存在下で活性の低下が少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質である。ここで、「欠失、置換又は付加」などの改変に係るアミノ酸の数は、好みくは1~30個、より好みしくは1~10個、さらに好みしくは1~6個である。

【0025】

さらに、改変タンパク質には、配列番号2又は配列番号4で表わされるアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸残基が、保存的置換されたアミノ酸配列を含んでなり、かつ界面活性剤存在下で活性の低下が少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質を包含する。ここで、「保存的置換」とは、タンパク質の活性を実質的に改変しないよう1個又は複数個のアミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸で置き換えることを意味する。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合などが挙げられる。このような保存的置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸は、アミノ酸毎に当該技術分野において公知である。具体的には、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン等が挙げられる。極性(中性)アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システイン等が挙げられる。陽電荷をもつ(塩基性)アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジン等が挙げられる。また、負電荷(酸性)アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。

【0026】

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド

本発明によれば、配列番号2又は配列番号4で表わされるアミノ酸配列、その改変タンパク質、および相同タンパク質(以下、単に「本発明のタンパク質」という)をコードするポリヌクレオチドが提供される。タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードする塩基配列は容易に定まり、よって、本発明のタンパク質をコードする種々の塩基配列を選択することができる。なお、本明細書において、用語「ポリヌクレオチド」にはDNAおよびRNAの両方が含まれ、DNAが好みしい。

【0027】

例えば、下記からなる群より選択される、ポリヌクレオチド：

(i) 配列番号1又は配列番号3で表わされる塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド

(ii) 前記(i)の塩基配列において、1個又は複数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列を含んでなり、かつ界面活性剤存在下で活性の低下が少ないエンドグルカ

ナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【0028】

前記(i)の塩基配列において、欠失、置換又は付加されてもよい塩基の数は、具体的には1~90個、好ましくは1~30個、より好ましくは1~18個、さらに好ましくは1~9個、である。

【0029】

本発明によるポリヌクレオチドは、天然由来のものであっても、全合成したものであつてもよく、また、天然由来のものの一部を利用して合成を行つたものであってもよい。本発明によるポリヌクレオチドの典型的な取得方法としては、微生物のゲノミックライブリーから、遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば、部分アミノ酸配列の情報を基にして作製した適当なDNAプローブを用いて、スクリーニングを行う方法などが挙げられる。

【0030】

本発明のタンパク質の生産

本発明のタンパク質は、それをコードするポリヌクレオチド断片を、宿主細胞内で複製可能且つ同遺伝子が発現可能な状態で含むポリヌクレオチド分子、特に発現ベクター、の形態として宿主細胞の形質転換を行い、その宿主細胞において產生させることができる。

【0031】

よつて、本発明においては、前記の本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド断片を、宿主微生物内で複製可能で、且つ、そのポリヌクレオチド断片がコードするタンパク質を発現可能な状態で含んでなる発現ベクターが提供される。

【0032】

本発現ベクターは、自己複製ベクター、すなわち、染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体の複製に依存しない、例えば、プラスミドを基本に構築することができる。また、本発現ベクターは、宿主微生物に導入されたとき、その宿主微生物のゲノム中に組み込まれ、それが組み込まれた染色体と一緒に複製されるものであつてもよい。本発明によるベクター構築の手順および方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

【0033】

本発明による発現ベクターは、これを実際に宿主微生物に導入して所望の活性を有するタンパク質を発現させるために、前記の本発明によるポリヌクレオチド断片の他に、その発現を制御するポリヌクレオチドや形質転換体を選択するための遺伝子マーカー等を含んでいるのが望ましい。

【0034】

本発明に用いる発現を制御するポリヌクレオチドとしては、プロモーター、ターミネーターおよび分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド等の転写調節信号、翻訳調節信号がこれに含まれる。これらの制御するポリヌクレオチドの連結およびベクターへの挿入は、常法により行なうことができる。

【0035】

本発明に用いるプロモーターは宿主微生物において転写活性を示すものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種又は異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するポリヌクレオチドとして得ることができる。プロモーターとしては、大腸菌においてはラクトースオペロン、トリプトファンオペロンなどのプロモーター、酵母ではアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子、酸性フォスファターゼ遺伝子、ガラクトース資化性遺伝子、グリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子などのプロモーター、カビと例ええば糸状菌では α -アミラーゼ遺伝子、グルコアミラーゼ遺伝子、セロビオハイドロラーゼ遺伝子、グリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子等のプロモーターを選択できる。

【0036】

また、シグナルペプチドは、宿主微生物において、タンパク質の分泌に寄与するもので

あれば特に限定されず、宿主微生物と同種又は異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子から誘導されるポリヌクレオチドより得ることができる。

【0037】

また、本発明における遺伝子マーカーは、形質転換体の選択の方法に応じて適宜選択されてよいが、例えば薬剤耐性をコードする遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を利用してよい。使用する宿主が細菌の場合は、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子などであり、使用する宿主が酵母の場合は、トリプトファン生合成遺伝子(*trp I*, *trp C*)、ウラシル生合成遺伝子(*ura 3*)、ロイシン生合成遺伝子(*leu 2*)、ヒスチジン生合成遺伝子(*his 3*)、使用する宿主がカビ、例えば糸状菌の場合は、デストマイシン耐性遺伝子、硝酸資化遺伝子(*n i a D*)、アルギニン生合成遺伝子(*arg B*)、ウラシル生合成遺伝子(*pyr 4*)、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ビアラホス耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子、オーレオバシジン耐性遺伝子などが挙げられる。

【0038】

本発明によれば、この発現ベクターによって形質転換された微生物が提供される。この宿主-ベクター系は特に限定されず、例えば、大腸菌、放線菌、酵母、糸状菌などを用いた系、およびそれらを用いた他のタンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。宿主として、酵母を用いる場合は、サッカロミセス属(*Saccharomyces*)、ハンゼヌラ属(*Hansenula*)、ピキア属(*Pichia*)に属する微生物などが、好ましくはサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)が挙げられる。糸状菌を用いる場合には、いかなる糸状菌を用いてもよいが、好ましくは、フミコーラ属、トリコデルマ属、アスペルギルス属、アクレモニウム属(*Acremonium*)、フザリウム属(*Fusarium*)に属する微生物であり、より好ましくは、フミコーラ属、又はトリコデルマ属が挙げられる。より具体的には、フミコーラ・インソレンス、フミコーラ・サーモイデア(*Humicola thermoiidea*)、トリコデルマ・ピリテ、トリコデルマ・レーセイ(*Trichoderma reesei*)、トリコデルマ・ロンジブラシアトウム(*Trichoderma longibrachiatum*)、スタフィロトリクム・ココスボラム、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリゼ、フザリウム・オキシスポーラム(*Fusarium oxysporum*)、又はアクレモニウム・セルロリティカス(*Acremonium cellulolyticus*)が挙げられるが、さらにより好ましくは、フミコーラ・インソレンス、又はトリコデルマ・ピリテが挙げられる。

【0039】

また、この発現ベクターによる微生物の形質転換も、この分野で慣用されている方法に従い実施することができる。好ましい具体例としては、カルシウムイオン法、リチウムイオン法、エレクトロポレーション法、PEG法、アグロバクテリウム法、パーテイクルガノン法などの常法を用いることができ、形質転換される宿主に応じて選択できる。

【0040】

本発明においては、本発明の形質転換体を培養し、その培養物から所望とする本発明のタンパク質を得ることができる。本発明による形質転換体の培養は、常法に従って、培地、培養条件などを適宜選択することにより行うことができる。

【0041】

培地としては、本発明の形質転換体が同化し得る炭素源、資化し得る窒素源、無機塩類、各種ビタミン、グルタミン酸又はアスパラギンなどの各種アミノ酸、ヌクレオチドなどの微量栄養素、抗生素などの選抜薬剤を添加することもできる。また、本発明の形質転換体の発育を助け、本発明のタンパク質の生産を促進するような有機物および無機物を適当に添加することができる。さらに、必要に応じてその他の栄養物をほどよく含有する合成功地または天然培地を使用することができる。

【0042】

培地に使用される炭素源および窒素源としては、本発明の形質転換体の利用可能なもの

であれば何れの種類でも良い。同化し得る炭素源としては、例えばショ糖、澱粉、グリセリン、グルコース、フラクトース、マルトース、ラクトース、セルロース、セロビオース、デキストリン、動物油、植物油、又はそれらの加水分解物などの種々の炭水化物が利用できる。その濃度は通常、培地に対して0.1%~5%であることが好ましい。資化し得る窒素源としては、例えばペプトン、肉エキス、コーン・スティープ・リカー、脱脂大豆粉などの動植物体成分、浸出エキス類、コハク酸アンモニウム塩類、酒石酸アンモニウムなどの有機酸アンモニウム類、尿素、又はその他各種無機酸若しくは有機酸などの含窒素化合物も使用可能である。また、無機塩類としては、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸又はその他のイオンを生成するとのできる塩類が適宜使用できる。

【0043】

その他の成分として、例えば酵母などの微生物の菌体、浸出液および浸出エキスなど、また植物体の細末を含む培地であっても本発明の形質転換体の生育および本発明のタンパク質の生産蓄積を妨げない限り何れをも適宜使用し得る。また、栄養要求性を示す変異株を培養する場合には、その栄養要求性を満足させ得る物質を培地に加えるが、この種の栄養素は、天然物を含む培地を使用する場合は、特に添加を必要としない場合がある。

【0044】

これらの培地組成、培地の液性、培養温度、攪拌速度、通気量などの培養条件は、使用する形質転換体および外部の条件などに応じて好ましい結果が得られるように適宜調節、選択されることはいうまでもない。液体培養において、発泡があるときは、シリコン油、植物油、鉱物油、界面活性剤などの消泡剤を適宜使用できる。

【0045】

このようにして得られた培養物に蓄積される本発明のタンパク質は、本発明の形質転換体内および培養濾液中に含有されるので、培養物を遠心分離して培養物と形質転換体とに分離し、各々から本発明のタンパク質を採取することが可能である。

【0046】

培養濾液から本発明のタンパク質を採取するには、常法に従い、培養物から本発明のタンパク質を採取するのに用いられる手段を、単独若しくは任意の順序に組合せ又は反復して用いられる。すなわち、例えば抽出濾過、遠心分離、透析、濃縮、乾燥、凍結、吸着、脱着、各種溶液に対する溶解度の差を利用した方法（例えば沈殿、塩析、結晶化、再結晶、転溶、クロマトグラフィー等）等の手段が用いられる。

【0047】

また、本発明の形質転換体内の培養物から、本発明のタンパク質を取得することができる。常法に従い、例えば培養物から抽出（磨碎処理、加圧破碎等）、回収（濾過、遠心分離など）および精製（塩析法、溶媒沈殿法等）等手法が用いられる。

【0048】

得られた粗物質は、常法に従い、例えばデキストラン、セルロース、アガロース、合成ポリマー、シリカゲルなどの担体を用いる各種カラムクロマトグラフィーにより精製することができる。上記に示した方法、又はこれらを適宜組み合わせることにより、本発明の形質転換体の培養物から所望とする純粋な本発明のタンパク質が得られる。

【0049】

従って、本発明の別の態様によれば、前記の本発明による新規タンパク質の製造方法が提供される。形質転換体の培養およびその条件は、使用的微生物についてのそれと本質的に同等であつてよい。また、形質転換体を培養した後、目的のタンパク質を回収する方法は、この分野で慣用されているものを用いることができる。

【0050】

寄託菌株

本発明による発現ベクターpEGD01で形質転換された大腸菌JM109株（FERM BP-5973は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター〔（旧）通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（あて名：〒305-8566 日本国茨

城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)] に、平成8年(1996年)7月12日より国内寄託されたものであり、平成9年(1997年)6月13日から国際寄託に移管されている。国際受託番号(国際受託番号に続く[]内は国内受託番号)は、FERM B P-5973 [FERM P-15729]である。

【0051】

本発明による発現ベクターpMKD01で形質転換された大腸菌JM109株(FERM BP-5974)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター[(旧)通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(あて名:〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)] に、平成8年(1996年)7月12日より国内寄託されたものであり、平成9年(1997年)6月13日から国際寄託に移管されている。国際受託番号(国際受託番号に続く[]内は国内受託番号)は、FERM B P-5974 [FERM P-15730]である。

【0052】

プラスミドpCB1-M2XRで形質転換された大腸菌JM109株(FERM BP-6045)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター[(旧)通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(あて名:〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)] に、平成8年(1996年)9月9日より国内寄託されたものであり、平成9年(1997年)8月11日から国際寄託に移管されている。国際受託番号(国際受託番号に続く[]内は国内受託番号)は、FERM BP-6045 [FERM P-15840]である。

ここで、本発明によるプラスミドpCB1-M2は、後述する実施例に記載の方法から取得する以外の態様として、例えばプラスミドpCB1-M2XRを制限酵素XbaIで消化し、自己閉環することによっても得ることができる。

【0053】

本発明による発現ベクターの宿主となりうるフミコーラ・インソレンス MN200-1株(FERM BP-5977)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター[(旧)通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(あて名:〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)] に、平成8年(1996年)7月15日より国内寄託されたものであり、平成9年(1997年)6月13日から国際寄託に移管されている。国際受託番号(国際受託番号に続く[]内は国内受託番号)は、FERM BP-5977 [FERM P-15736]である。

【0054】

本発明による発現ベクターの宿主となりうるトリコデルマ・ビリデ MC300-1株(FERM BP-6047)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター[(旧)通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(あて名:〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)] に、平成8年(1996年)9月9日より国内寄託されたものであり、平成9年(1997年)8月11日から国際寄託に移管されている。国際受託番号(国際受託番号に続く[]内は国内受託番号)は、FERM BP-6047 [FERM P-15842]である。

【0055】

プラスミドpUC118-STCEexで形質転換された大腸菌DH5 α (FERM P-19602)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(あて名:〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に、平成15年(2003年)12月1日に国内寄託されたものである。国際受託番号は、FERM P-19602である。尚、プラスミドpUC118-STCEexの構築、および挿入されているエンドグルカナーゼSTCE1遺伝子(BamHI断片)については、特願2003-404020号明細書を参照することが可能である。このBamHI断片に含まれるエンドグルカナーゼSTCE1遺伝子は、イントロンを含み、配列番号5に表される配列を有する。

【0056】

以下に本発明の実施例を示すが、これは単なる一例であって本発明を限定するものではなく、ここに例示しなかつた多くの変法あるいは修飾手段のすべてを包括するものである。

[0057]

実施例 A 1 フミコーラ・インソレンス用 N 末端付加型セルラーゼ発現ベクターおよび天然型セルラーゼ発現ベクターの構築

(1) N末端付加型セルラーゼ発現ベクター pMKD01 の構築

(1) N末端付加型セルソーラー完焼^{タカラバイオ}をBamH Iで消化し、得られる断片をプラスミドpUC118(タカラバイオ社製)を用いて末端を平滑化した。これをDNAプランチングキット(タカラバイオ社製)を用いて自己閉環させpUC118-BNライゲーションキット(タカラバイオ社製)を用いて自己閉環させ、pUCを得た。このpUC118BNをSphIで消化し、末端平滑化、自己閉環させ、pUC118BSNを得た。次に、フミコーラ・インソレンス MN200-1株(FERM B-P-5977)から、特開平8-126492号公報に記載の方法にしたがって、セルラーゼNCE2遺伝子の全長を含むPstI-XbaI断片3.4kbを得た。これを同様の制限酵素で消化しておいたpUC118BSNと連結し、pUC118BSN-PXを得た。このpUC118BSN-PXに部位指定変異をスカルプターインビトロミュータジェネシスシステム(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて導入し、プラスミドpM21を構築した。変異導入用オリゴヌクレオチドMNC-02およびMNC-03を用いた。

[0058]

MNC-02 : 5' - GAGCGCCAGAACCTGTGGATCCACTTGGTG
 AGCAATG-3' (配列番号6)
 MNC-03 : 5' - TCCGCCGTTCTGAGCGGATCCAGGCGTT
 GGCGCG-3' (配列番号7)

[0059]

【0059】このプラスミドpM21をBamHIで消化し、これにフミコーラ・インソレンス M N200-1株由来セロビオハイドロラーゼ遺伝子(NCE3)のPCR断片をBamH Iで消化したものを連結し、プラスミドpKM04を得た。NCE3のPCR断片は、以下のプライマー-MKA-05およびMKA-06を用い、フミコーラ・インソレンス M N200-1株(FERM BP-5977)由来ゲノムDNA(国際公開第98/03640号パンフレット)を鋳型に増幅した。

[0060]

MKA-05 : 5' - GCGGCCAGCAGGCGGGATCCCTCACCA
 CGAGAGG - 3' (配列番号8)
 MKA-06 : 5' - TGATCGTCGAGTCAGGGATCCAGAATT
 ACGGCAC - 3' (配列番号9)

[0061]

前記プラスミド pKM04 に、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) 由来 *trpC* 遺伝子のプロモーターおよびターミネーター (Mullaney, E. J., et al., Mol. Genet. 199, 37-45, 1985) を用いて特開昭59-175889号公報に記載されているデストマイシン耐性遺伝子をフミコーラ・インソレンスで発現可能にした遺伝子を作製した。これを XbaI で消化しておいたプラスミド pKM04 と連結し、N 末端付加型セルラーゼ発現ベクター pMKD01 (FERM BP-5974) を構築した。この pMKD01 は、NCE2 遺伝子の成熟タンパク質の N 末端より下流 10 bp、終止コドンより下流 3 bp に BamH I 認識配列を変異導入してあるので、所望のファミリー 45 に属するセルラーゼの N 末端に更に 5 アミノ酸残基が付加するような構成となる。

[0062]

【表1】

[0063]

(2) 天然型セルラーゼ発現ベクター pJD01 の構築

前記(1)で得られたプラスミドpM21にオリゴヌクレオチドpMN-Bamを用いて部位特異的変異を導入し、変異導入プラスミドpM21-m-A1を得た。

[0064]

pMN-Bam: 5' -GGTCAAACAAAGTCTGTGCGGATCCTGGG
ACAAGATGGCCAAGTTCTTCCTTAC-3' (配列番号12)

[0065]

このpM21-m-A1を制限酵素HindIIIおよびBamH Iで消化し、得られた約1kbの断片を回収した。次に、実施例A1(1)により得られたpMKD01をHindIIIおよびBamH Iで消化し、約7kbの断片を回収した。これらの断片を連結し、プラスミドpJD01を得た。本ベクターは、NCE2遺伝子の翻訳開始点より上流15bp、終止コドンより下流3bpにBamH I認識配列を変異導入してあるので、転写開始点から所望のファミリー45に属するセルラーゼが発現するような構成となる。

[0066]

【表2】

BamHI BamHI
 5'-tgcggatcctgggacaagATGGCC- - -CCGTTCTGAg_cggatccagg-3' 配列番号 13)
 Me tAla- - -ProPhe 配列番号 14)

[0067]

実施例 A 2 天然型NCE4発現ベクターおよびN末端付加型NCE4発現ベクターの構築、並びにフミコーラ・インソレンスへの形質転換および活性評価

(1) 発現ベクターの構築

(1) 先記ノイズ前記 天然型NCE4発現ベクターとして、実施例A1(2)により得られたpJD01に、NCE4遺伝子の翻訳領域全長を連結し、pN2EX-N4を構築した。 まず、NCE4遺伝子の翻訳領域全長を、プライマーNCE4-NおよびNCE4-Cの組み合わせで前記フミコーラ・インソレンス MN200-1株由来ゲノムDNAを鋳型にPCRを行い、得られる約0.9kbpのPCR産物をBamHIで消化したものを調製した。これを同様の制限酵素で消化しておいたpJD01と連結し、pN2EX-N4を構築した。

[0068]

NCE 4-Ne : 5' - GGGGGGATCCTGGGACAAGATGCGTTCC
 TCCCCCTCTC-3' (配列番号 15)
 NCE 4-Ce : 5' - GGGGGGATCCCTGCGTTACAGGCAC TG
 ATGG-3' (配列番号 16)

[0069]

N末端付加型NCE4発現ベクターとして、実施例A1(1)により得られたpMKD01(FERM BP-5974)に、NCE4遺伝子の分泌シグナル配列を除いた成熟タンパク質翻訳領域を連結し、pEGD01(FERM BP-5973)を構築した。また、NCE4遺伝子の成熟タンパク質翻訳領域をプライマー-NCE4-MNおよびNCE4-Cの組み合わせで前記フミコーラ・インソレンス MN200-1株由来ゲノムDNAを鋳型にPCRを行い、得られる約0.8 kbpのPCR産物をBamHIで消化し

たものを調製した。これを同様の制限酵素で消化しておいたpMKD01と連結し、pEGD01を構築した。

【0070】

NCE4-Ns : 5' - CCGGTGTTGCCGGATCCGCTGATGGCA
AG-3' (配列番号17)

NCE4-Cs : 5' - TAAGGCCCTCAAGGATCCCTGCGTCTAC
AG-3' (配列番号18)

【0071】

(2) 天然型NCE4およびN末端付加型NCE4を有する形質転換体

フミコーラ・インソレンス MN200-1株をS培地(3.0%グルコース、2.0%酵母エキス、0.1%ポリペプトン、0.03%塩化カルシウム、0.03%硫酸マグネシウム、pH6.8)、37℃で24時間培養し、遠心分離により菌糸体を回収し、0.5mol/Lシュークロースで洗浄した。これを3mg/ml β-グルクロニダーゼ(シグマ社製)、1mg/mlキチナーゼおよび1mg/mlザイモリアーゼ20T(化学工業社製)を含む0.5mol/Lシューカロース溶液に懸濁し、30℃で60~90分間緩やかに震とうし、プロトプラスト化した。得られたプロトプラストをろ過後、遠心分離により回収し、SUTC緩衝液(0.5mol/Lシューカロース、10mmol/L塩化カルシウム、10mmol/Lトリス塩酸、pH7.5)で洗浄し、再度SUTCに懸濁したものプロトプラスト懸濁液とした。

1.00μlのプロトプラスト懸濁液に対し、10μlのDNA(pEGD01又はpN2EX-N4)溶液を加え、氷冷下で5分間静置し、400μlのPEG溶液(60%ポリエチレングリコール4000、10mmol/L塩化カルシウム、10mmol/Lトリス塩酸、pH7.5)を加え、更に20分間氷冷下で静置した。以上の処理をしたプロトプラスト懸濁液は、SUTC緩衝液で洗浄し、200μg/mlのハイグロマイシンBを含むYMG培地(1%グルコース、0.4%酵母エキス、0.2%麦芽エキス、1%寒天、pH6.8)にYMG軟寒天とともに重層し、37℃で5日間培養し、生育したコロニーを形質転換体とした。

【0072】

(3) 培養上澄中の天然型NCE4およびN末端付加型NCE4のEGU活性の比較

得られた形質転換体を国際公開第98/03667号パンフレットに準じて培養し、その培養上澄を得た。この培養上澄をSDS-PAGEに供し、約43kDaのNCE4のバンドが良好に検出される培養上澄を選抜した。この培養上澄のpH1.0およびpH1.0におけるLAS添加区のEGU活性を測定し、その低下の程度を比較した結果を表3に示す。表3はpH1.0のEGU活性を100とし、その百分率で示した。

【0073】

【表3】

発現ベクター	EGU (%)	
	LAS非添加	LAS添加
天然型NCE4 pN2EX-N4	100	27.1
N末端付加型NCE4 pEGD01	100	55.6

【0074】

その結果、N末端付加型NCE4形質転換体から得られた培養上澄はLAS添加区での活性の減少が少なかった。LAS添加区のEGU活性を比較すると、N末端付加型NCE4は天然型NCE4の2.1倍の活性を有することが判明した。このときフミコーラ・インソレンス MN200-1株のEGU活性は形質転換体の約4%であることから、これらのEGU活性はそのほとんどが導入された発現ベクターによって発現された組換え酵素に由来することが判明した。

【0075】

(4) 天然型NCE4およびN末端付加型NCE4のN末端アミノ酸配列の解析
前記形質転換体の培養上澄をSDS-PAGEに供し、電気泳動されたタンパク質をPVDF膜(ミリポア社製Immobilon-PSQ)に電気的に転写した。このプロットから約43kDaのNCE4のバンドを切り出した。これをプロテインシーカー(エントラーモデル492(アプライドバイオシステムズ社製))に供し、アミノ酸配列を解読した。

【0076】

その結果、pN2EX-N4形質転換体から得られた天然型NCE4は、国際公開第98/03667号パンフレットに記載されたフミコーラ・インソレンス MN200-1株由来のNCE4のDNA配列と一致することを確認した。

一方、同様の手法によりpEGD01形質転換体から得られたN末端付加型NCE4はアミノ酸配列が解読できなかった。そこで、Pfu pyroglutamate amidopeptidase(タカラバイオ社製)を用いて修飾N末端を除去し、再度アミノ酸配列を解読した(配列番号2)。

これらの結果を基に、天然型NCE4およびN末端付加型NCE4のN末端アミノ酸およびその配列を比較するため、表4にまとめた。このことから構築した発現ベクターおよびN末端アミノ酸配列を有するNCE4であることが明らかとなった。

【0077】

【表4】

	N末端アミノ酸	N末端アミノ酸配列
天然型NCE4	アラニン(未修飾)	ADGKSTR(配列番号19)
N末端付加型NCE4	ピログルタミン酸(修飾)	pQNCGSADGKSTR(配列番号20)

【0078】

実施例B1 トリコデルマ・ビリデ用N末端付加型セルラーゼ発現ベクターおよび天然型セルラーゼ発現ベクターの構築

(1) 発現ベクターの構築

国際公開第98/11239号パンフレットに準じて得られるトリコデルマ・ビリデMC300-1株由来cbh1遺伝子の全長を含む7kbのPstI断片からcbh1プロモーター領域を含む約3.1kbのHindIII断片およびターミネーター領域を含む2.7kbのSalI断片をプラスミドpUC119にクローン化したもの(それぞれプラスミドpCB1-H4およびプラスミドpCB1-S1)を構築した。このプラスミドを保持する大腸菌JM109株にヘルパーファージM13KO7を感染させることにより一本鎖DNAを得た。これらを鋳型に、リン酸化したオリゴヌクレオチドCBn-StuおよびCBc-XhoをそれぞれプラスミドpCB1-H4およびプラスミドpCB1-S1にアニールさせ、スカルプターインビトロミュータジエネシスシステム(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて変異を導入し、それこれからプラスミドpCB1H4-19およびpCB1S1-17を構築した。次に、プラスミドpCB1H4-19をXbaIおよびXhoIで消化し、得られる約6kbの断片と、プラスミドpCB1S1-17をXbaIで消化後、XhoIで部分的に消化し、得られる約1.2kbの断片を連結し、pCB1-Mを構築した。

【0079】

CBn-Stu: 5' - GATACATGATGCGCAGGCCCTTAGTCGAC
TAGAATGC-3' (配列番号21)
CBc-Xho: 5' - GATCCTCAAGCTTTGCTCGAGTACCTT
ACAAGCAC-3' (配列番号22)

【0080】

次に、pCB1-MをSa1Iで消化し、約2.7kbの断片をプラスミドpUC119にクローン化し、プラスミドpCB1-Sa1Mを構築した。これを更に一本鎖DNAとし、リン酸化したオリゴヌクレオチドCB1-SmSph、CB1-BamおよびCB1-Pstをアニールさせ、スカルプターインピトロミュータジェネシスシステムを用いて変異を導入した。

【0081】

CB1-SmSph: 5' -GGAGGGTGCATGCCGACTGAGGCCGG
GCAGTAGCC-3' (配列番号23)
CB1-Bam: 5' -GCCGGGAGAGGATCCAGTGGAGG-3' (配列番号24)
CB1-Pst: 5' -GCTCGAGTACCTTACTGCAGGCAGTGAG
AG-3' (配列番号25)

【0082】

次に、プラスミドpUC118をXbaIおよびEcoRIで消化し、DNAプランチングキットを用いて平滑化し、自己閉環し、プラスミドpUC118-SBNを構築した。このpUC118-SBNをHindIIIおよびSa1Iで消化し、同様の制限酵素で切り出される約1.4kbのcbh1プロモーター断片をクローン化した。これをSa1Iで消化し、全ての変異が導入された約2.8kbのcbh1翻訳領域およびターミネーター領域を連結し、pCB1-M2を構築した。導入した変異は下図の通りである(BamHIの変異は示していない)。

【0083】

【表5】

Sa1I StuI
5'-ctagtcgactaaggcctgcgcatac ATGTATCAAAAGTTGGCCCTCATCTGGCCTCTGGCTACT 酪麴菌26)
Me tTyrGlnLysLeuAlaLeuIleSerAlaPheLeuAlaThr 酪麴菌27)

SmaI SphI PstI XhoI HindIII
5'-CCCCGGGCTCAGTOGGCATGCACC -- CAGTGCCTGCAGTAAggtactcgagcaaaagcttgag-3' 酪麴菌28)
AlaArgAlaGlnSerAlaCysThr -- GlnCysLeuGln 酪麴菌29)
↑成熟タンパク質のN末端

【0084】

実施例B2 N末端付加型STCE1発現ベクターおよび天然型STCE1発現ベクターの構築、並びにフミコーラ・インソレンスへの形質転換および活性評価

【0085】

(1) 発現ベクターの構築

天然型STCE1発現ベクターとして、実施例B1により得られたプラスミドpCB1-M2に、STCE1遺伝子の翻訳領域を連結し、pCB-Steを構築した。まず、STCE1遺伝子の翻訳領域を、プライマー-STCE1-TNERVおよびSTCE1-TCET22Iの組み合わせで、プラスミドpUC118-STCEEex(FETCE1-TCET22I)を鋳型にPCRを用いて增幅し、得られる約1kbのPCR産物をEcoRVおよびEcoT22Iで消化したものを調製した。これをStuIおよびPstIで消化しておいたpCB1-M2と連結し、pCB-Steを構築した。

【0086】

STCE1-TNERV: GGGGATATCGCGCATCATGCGTTCTC
CCCCGTCCTC (配列番号30)
STCE1-TCET22I: GGGATGCATTAAAGGCAGTGCGAG
TACCAAGTC (配列番号31)

【0087】

N末端付加型STCE1発現ベクターとして、実施例B1により得られたプラスミドp

CB1-M2に、STCE1遺伝子の翻訳領域のうち分泌シグナル配列を除いた成熟タンパク質翻訳領域を連結し、pCB-Stsを構築した。

まず、STCE1遺伝子の成熟タンパク質翻訳領域を、プライマーSTCE1-TmN SphおよびSTCE1-TCE T22Iの組み合わせで、プラスミドpUC118-S TCE ex (FERM P-19602)を鋳型にPCRを用いて増幅し、得られる約1 kb pのPCR産物をSph IおよびEco T22Iで消化したものを調製した。これをSph IおよびPst Iで消化しておいたpCB1-M2と連結し、pCB-Stsを構築した。

【0088】

STCE1-TmNSph: GGGGCATGCGATGGCAAGTCGACCCG
CTAC (配列番号32)

【0089】

(2) *Trichoderma viride* strain 2株の作出
トリコデルマ・ビリデ MC300-1株 (FERM BP-6047) の 10^9 CFU/m¹程度の胞子懸濁液をUV灯2灯を30cmの高さで点灯下、緩やかに混和しながら照射した。これを選択培地に塗布し、28℃で7日間培養した。生育した株を選抜し、トリコデルマ・ビリデのウラシル要求株であるトリコデルマ・ビリデ strain 2株を取得した。

この選択培地は、最少培地 (0.2%リン酸2水素1カリウム、0.4%硫酸アンモニウム、0.03%尿素、0.03%硫酸マグネシウム7水和物、0.03%塩化カルシウム、0.5%グルコース、2.5%寒天、0.01%トレースエレメント (5mg硫酸鉄ム、1.56mg硫酸マンガン7水和物、1.4mg硫酸亜鉛7水和物、2mg塩7水和物、1.56mg硫酸マanganese7水和物、1.4mg硫酸亜鉛7水和物、2mg塩化コバルトを1Lの水に溶解したもの)) に $10\mu g/m^1$ のウリジンおよび1mg/m¹の5-フルオロオロチノン酸を添加したものである。

【0090】

(3) 天然型STCE1およびN末端付加型STCE1を有する形質転換体
実施例B2(1)により得られたpCB-St eおよびpCB-Stsのトリコデルマ・ビリデへの形質転換は、実施例B2(2)により得られたトリコデルマ・ビリデ strain 2株にニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) 由来pyr4遺伝子を含むマーカープラスミドpPYR4とコトランスクローメーション (cotransformation) 法で行い、最少培地で生育する株を形質転換体とした。

まず、トリコデルマ・ビリデ strain 2株を、50m¹の菌体形成培地 (1%イーストエキス、1%モルトエキス、2%ポリペプトン、2.5%グルコース、0.1%リン酸水素2カリウム、0.05%硫酸マグネシウム7水和物、0.0001%ウリジン (pH 7.0)) が分注された200m¹の三角フラスコに植菌し、28℃で2日間培養し、得られた菌体を遠心分離により回収し、0.5mol/Lシュークロースで洗浄した。これを5mg/m¹ β-グルクロニダーゼ (シグマ社製)、1mg/m¹キチナーゼおよび1mg/m¹ザイモリアーゼ20T (生化学工業社製) を含む0.5mol/Lシュークロース溶液に懸濁し、30℃で60~90分間緩やかに震とうし、プロトプラスト化した。得られたプロトプラストをろ過後、遠心分離により回収し、SUTC緩衝液で洗浄し、SUTEに懸濁したものをプロトプラスト懸濁液とした。

100μlのプロトプラスト懸濁液に対し、10μlのDNA (pCB-St e又はpCB-Sts) 溶液を加え、氷冷下で5分間静置し、400μlのPEG溶液を加え、更に20分間氷冷下で静置した。以上の処理をしたプロトプラスト懸濁液は、SUTC緩衝液で洗浄し、0.5mol/Lシュークロースを含む最少培地に軟寒天とともに重層し、28℃で5日間培養し、生育したコロニーを再度最少培地に移植し、ここで生育したコロニーを形質転換体とした。

【0091】

(4) 培養上澄中の天然型STCE1およびN末端付加型STCE1のEGU活性の比較

得られた形質転換体を国際公開第98/11239号パンフレットに準じて培養し、その培養上澄を得た。この培養上澄をSDS-PAGEに供し、約45kDaのSTCE1のバンドが良好に検出される培養上澄を選抜した。この培養上澄のpH1.0およびpH1.0におけるLAS添加区のEGU活性を測定し、その低下の程度を比較した結果を表6に示す。表6はpH1.0のEGU活性を100とし、その百分率で示した。

【0092】

【表6】

発現ベクター	EGU (%)	
	LAS非添加	LAS添加
天然型STCE1 pCB-S te	100	14.5
N末端付加型STCE1 pCB-S ts	100	25.9

【0093】

その結果、LAS添加区のEGU活性を比較すると、N末端付加型STCE1は天然型STCE1の約1.8倍の活性を有することが判明した。このときトリコデルマ・ビリデstrain2株のEGU活性は検出されないことから、これらのEGU活性は導入されたベクターによって発現された組換え酵素に由来することが判明した。

【0094】

(5) 天然型STCE1およびN末端付加型STCE1のN末端アミノ酸配列の解析

前記形質転換体の培養上澄を0.05mol/Lトリス塩酸(pH8.0)、1mol/L硫酸ナトリウム溶液とし、同等のベッドボリューム(BV)のトヨパールブル650C(東ソー社製)に吸着させ、3BVの0.05mol/Lトリス塩酸(pH8.0)、1mol/L硫酸ナトリウムで非吸着成分を洗浄した。これを3BVの0.05mol/Lトリス塩酸(pH8.0)、0.5mol/L硫酸ナトリウムで溶出し、ペリコンX(L(cut 5000, ミリポア社製)およびウルトラフリー15(ultrafilter 5000, ミリポア社製)で濃縮し、0.1mol/Lリン酸ナトリウム(pH5.8)、1mol/L硫酸アンモニウム溶液とした。これをリソースPHE(6ml, アマシャムバイオサイエンス社製)の疎水クロマトグラフィーに供し、非吸着画分を回収した。この画分を濃縮し、PD-10(アマシャムバイオサイエンス社製)で脱塩し、0.05mol/Lトリス塩酸(pH7.5)溶液とし、リソースQ(6ml, アマシャムバイオサイエンス社製)に供し、非吸着画分を回収した。この画分は脱塩後、0.05mol/L酢酸ナトリウム(pH5.0)溶液とし、リソースS(6ml, アマシャムバイオサイエンス社製)に供し、非吸着画分を回収した。この画分を濃縮後、スーパーデックス75pg(16×60mm, アマシャムバイオサイエンス社製)のゲルろ過に供し、分画分子量約4500の画分を回収した。本画分は、45kDaのバンドが単一に含まれていた。

精製画分をSDS-PAGEに供し、電気泳動されたタンパク質をPVDF膜に電気的に転写した。このプロットから約45kDaのSTCE1のバンドを切り出した。これをプロテインシークエンサーModel 492(アプライドバイオシステムズ社製)に供し、アミノ酸配列を解読した。

その結果、pCB-S te形質転換体から得られた天然型STCE1は、スタフィロトリクム・ココスボラムIFO(現N B R C)31817株由来のSTCE1のDNA配列(配列番号5)と一致することを確認した。

一方、同様の手法によりN末端付加型STCE1形質転換体から得られたSTCE1はアミノ酸配列が解読できなかった。そこで、P fu pyroglyutamate amidopeptidase(タカラバイオ社製)を用いて修飾N末端を除去し、再度アミノ酸配列を解読した(配列番号4)。

これらの結果を基に、天然型STCE1およびN末端付加型STCE1のN末端アミノ酸およびその配列を比較するため、表7にまとめた。このことから構築した発現ベクター

通りのN末端アミノ酸配列を有するSTCE1であることが明らかとなった。

【0095】

【表7】

	N末端アミノ酸	N末端アミノ酸配列
天然型STCE1	アラニン(未修飾)	ADGKSTR(配列番号33)
N末端付加型STCE1	ピログルタミン酸(修飾)	pQSACDGKSTR(配列番号34)

【0096】

(6) 精製天然型STCE1および精製N末端付加型STCE1のEGU活性の比較
実施例B2(5)により得られた精製された天然型STCE1およびN末端付加型STCE1のpH10またはpH10におけるLAS添加区のEGU活性を測定し、その低下の程度を比較した結果を表8に示す。表8はpH10のEGU活性を100とし、その百分率で示した。

【0097】

【表8】

	EGU (%)	
	LAS非添加	LAS添加
精製天然型STCE1	100	16.2
精製N末端付加型STCE1	100	30.0

【0098】

その結果、LAS添加区のEGU活性を比較すると、精製N末端付加型STCE1は精製天然型STCE1の約1.9倍に向上していた。

【産業上の利用可能性】

【0099】

本発明のタンパク質は、天然型のセルラーゼと比較して、界面活性剤存在下でエンドグルカナーゼ活性の低下が少ないとから、衣料用洗浄剤に配合した場合に有用である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.

<120> The method for modification of detergent tolerant cellulase from which having endoglucanase activity

<130> PM1776

<160> 34

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 870

<212> DNA

<213> Humicola insolens MN200-1

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(870)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Pyroglutamic acid

<220>

<221> source

<222> (16)..(870)

<223> Humicola insolens MN200-1

<400> 1

cag aac tgt gga tcc gct gat ggc aag tcc acc cgc tac tgg gac tgc
 Gln Asn Cys Gly Ser Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys
 1 5 10 15

48

tgc aag cct tcg tgc ggc tgg gcc aag aag gct ccc gtg aac cag cct
 Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro
 20 25 30

96

gtc ttc tcc tgc aac gcc aac ttc cag cgt ctc act gac ttc gac gcc
 Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Leu Thr Asp Phe Asp Ala
 35 40 45

144

aag tcc ggc tgc gag ccg ggc ggt gtc gcc tac tcg tgc gcc gac cag

192

出証特2004-3123108

Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln
 50 55 60

acc cca tgg gct gtg aac gac gac ttc gcg ttc ggt ttt gct gcc acc 240
 Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Phe Gly Ala Ala Thr
 65 70 75 80
 65

tct att gcc ggc agc aat gag gcg ggc tgg tgc tgc gcc tac gag 288
 Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
 85 90 95
 85

ctc acc ttc aca tcc ggt cct gtt gct ggc aag aag atg gtc gtc cag 336
 Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln
 100 105 110
 100

tcc acc agc act ggc ggt gat ctt ggc agc aac cac ttc gat ctc aac 384
 Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn
 115 120 125
 115

atc ccc ggc ggc ggc gtc atc ttc gac gga tgc act ccc cag ttc 432
 Ile Pro Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe
 130 135 140
 130

ggc ggt ctg ccc ggc cag cgc tac ggc ggc atc tcg tcc cgc aac gag 480
 Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu
 145 150 155 160
 145

tgc gat cgg ttc ccc gac gcc ctc aag ccc ggc tgc tac tgg cgc ttc 528
 Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe
 165 170 175
 165

gac tgg ttc aag aac gcc gac aac ccg agc ttc agc ttc cgt cag gtc 576
 Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Arg Gln Val
 180 185 190
 180

caa tgc cca gcc gag ctc gct cgc acc gga tgc cgc cgc aac gac 624
 Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp
 195 200 205
 195

gac ggc aac ttc cct gcc gtc cag atc ccc tcc agc agc acc agc tct 672
 Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Thr Ser Ser
 210 215 220
 210

ccg gtc ggc cag cct acc agt acc agc acc acc tcc acc tcc acc acc 720
 Pro Val Gly Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr
 225 230 235 240
 225

tcg agc ccg ccc gtc cag cct acg act ccc agc ggc tgc act gct gag 768
 Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu
 245 250 255
 245

agg tgg gct cag tgc ggc ggc aat ggc tgg agc ggc tgc acc acc tgc 816
 Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys
 260 265 270

gtc gct ggc agc acc tgc acg aag att aat gac tgg tac cat cag tgc 864
 Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys
 275 280 285

ctg taa 870
 Leu

<210> 2
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Humicola insolens MN200-1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> PYRROLIDONE CARBOXYLIC ACID (Pyroglutamic acid)

<400> 2
 Gln Asn Cys Gly Ser Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys
 1 5 10 15

Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro
 20 25 30

Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Leu Thr Asp Phe Asp Ala
 35 40 45

Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln
 50 55 60

Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Phe Gly Phe Ala Ala Thr
 65 70 75 80

Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
 85 90 95

Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln
 100 105 110

Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn
 115 120 125

Ile Pro Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe
 130 135 140

Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu
 145 150 155 160

Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe
 165 170 175

Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Arg Gln Val
 180 185 190

Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp
 195 200 205

Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser
 210 215 220

Pro Val Gly Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Thr Thr
 225 230 235 240

Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu
 245 250 255

Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys
 260 265 270

Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys
 275 280 285

Leu

出証特2004-3123108

<210> 3
<211> 897
<212> DNA
<213> *Staphylotrichum coccosporum* IFO 31817

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)
<223>

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Pyroglutamic acid

<220>
<221> source
<222> (13)..(897)
<223> *Staphylotrichum coccosporum* IFO 31817

<400> 3		48
cag tcg gca tgc gat ggc aag tcc acc cgc tac tgg gac tgc tgc aag		
Gln Ser Ala Cys Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys		
1 5 10 15		
cct tcg tgc tcg tgg ccc ggc aag gcc tcg gtg aac cag ccc gtc ttc		96
Pro Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Asn Gln Pro Val Phe		
20 25 30		
gcc tgc agc gcc aac ttc cag cgc atc agc gac ccc aac gtc aag tcg		144
Ala Cys Ser Ala Asn Phe Gln Arg Ile Ser Asp Pro Asn Val Lys Ser		
35 40 45		
ggc tgc gac ggc ggc tcc gcc tac gcc tgc gac cag acc ccg tgg		192
Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Ala Asp Gln Thr Pro Trp		
50 55 60		
gcc gtc aac gac aac ttc tcg tac ggc ttc gcc gcc acg tcc atc tcg		240
Ala Val Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ser Ile Ser		
65 70 75 80		
ggc ggc aac gag gcc tcg tgg tgc tgt ggc tgc tac gag ctg acc ttc		288
Gly Gly Asn Glu Ala Ser Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Glu Leu Thr Phe		
85 90 95		

acc tcg ggc ccc gtc gct ggc aag acc atg gtt gtc cag tcc acc tcg Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser 100 105 110	336
acc ggc ggc gac ctc ggc acc aac cac ttc gac ctg gcc atg ccc ggt Thr Gly Gly Asp Leu Gly Thr Asn His Phe Asp Leu Ala Met Pro Gly 115 120 125	384
ggt ggt gtc ggc atc ttc gac ggc tgc tcg ccc cag ttc ggc ggc ctc Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Ser Pro Gln Phe Gly Gly Leu 130 135 140	432
gcc ggc gac cgc tac ggc gtc tcg tcg cgc agc cag tgc gac tcg Ala Gly Asp Arg Tyr Gly Gly Val Ser Ser Arg Ser Gln Cys Asp Ser 145 150 155 160	480
ttc ccc gcc ctc aag ccc ggc tgc tac tgg cgc ttc gac tgg ttc Phe Pro Ala Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe 165 170 175	528
aag aac gcc gac aac ccg acc ttc acc ttc cgc cag gtc cag tgc ccg Lys Asn Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Arg Gln Val Gln Cys Pro 180 185 190	576
tcg gag ctc gtc gcc cgc acc ggc tgc cgc cgc aac gac gac ggc aac Ser Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp Asp Gly Asn 195 200 205	624
ttc ccc gtc ttc acc cct ccc tgc ggc ggt cag tcc tcc tcg tct tcc Phe Pro Val Phe Thr Pro Pro Ser Gly Gly Gln Ser Ser Ser Ser Ser 210 215 220	672
tcc tcc agc agc gcc aag ccc acc tcc acc tcc acc tcg acc acc tcc Ser Ser Ser Ala Lys Pro Thr Ser Thr Ser Thr Ser Thr Ser Thr Ser 225 230 235 240	720
acc aag gct acc tcc acc acc tcg acc gcc tcc agc cag acc tcg tcg Thr Lys Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ala Ser Ser Gln Thr Ser Ser 245 250 255	768
tcc acc ggc ggc ggc tgc gcc gcc cag cgc tgg gcg cag tgc ggc ggc Ser Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gln Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly 260 265 270	816
atc ggg ttc tcg ggc tgc acc acg tgc gtc agc ggc acc acc tgc aac Ile Gly Phe Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr Thr Cys Asn 275 280 285	864
aag cag aac gac tgg tac tcg cag tgc ctt taa Lys Gln Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu	897

290

295

<210> 4
<211> 298
<212> PRT
<213> *Staphylotrichum coccosporum* IFO 31817

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> PYRROLIDONE CARBOXYLIC ACID (Pyroglutamic acid)

<400> 4

Gln	Ser	Ala	Cys	Asp	Gly	Lys	Ser	Thr	Arg	Tyr	Trp	Asp	Cys	Cys	Lys
1								10						15	

Pro	Ser	Cys	Ser	Trp	Pro	Gly	Lys	Ala	Ser	Val	Asn	Gln	Pro	Val	Phe
									25				30		

Ala	Cys	Ser	Ala	Asn	Phe	Gln	Arg	Ile	Ser	Asp	Pro	Asn	Val	Lys	Ser
								35				40		45	

Gly	Cys	Asp	Gly	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ala	Cys	Ala	Asp	Gln	Thr	Pro	Trp
								50				55	60		

Ala	Val	Asn	Asp	Asn	Phe	Ser	Tyr	Gly	Phe	Ala	Ala	Thr	Ser	Ile	Ser
								65				70	75	80	

Gly	Gly	Asn	Glu	Ala	Ser	Trp	Cys	Cys	Gly	Cys	Tyr	Glu	Leu	Thr	Phe
								85				90	95		

Thr	Ser	Gly	Pro	Val	Ala	Gly	Lys	Thr	Met	Val	Val	Gln	Ser	Thr	Ser
								100				105		110	

Thr	Gly	Gly	Asp	Leu	Gly	Thr	Asn	His	Phe	Asp	Leu	Ala	Met	Pro	Gly
								115				120	125		

Gly	Gly	Val	Gly	Ile	Phe	Asp	Gly	Cys	Ser	Pro	Gln	Phe	Gly	Gly	Leu
								130				135	140		

Ala Gly Asp Arg Tyr Gly Gly Val Ser Ser Arg Ser Gln Cys Asp Ser
 145 150 155 160

Phe Pro Ala Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe
 165 170 175

Lys Asn Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Arg Gln Val Gln Cys Pro
 180 185 190

Ser Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp Asp Gly Asn
 195 200 205

Phe Pro Val Phe Thr Pro Pro Ser Gly Gly Gln Ser Ser Ser Ser
 210 215 220

Ser Ser Ser Ala Lys Pro Thr Ser Thr Ser Thr Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Thr Lys Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ala Ser Ser Gln Thr Ser Ser
 245 250 255

Ser Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gln Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly
 260 265 270

Ile Gly Phe Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr Thr Cys Asn
 275 280 285

Lys Gln Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
 290 295

<210> 5
 <211> 1037
 <212> DNA
 <213> *Staphylococcus coccusporum* IFO 31817

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(63)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (64)..(333)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (334)..(419)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (420)..(1037)

<223>

<400> 5 atgcgttcct ccccggtcct ccgcacggcc ctggccgctg ccctccccct ggccgcctc	60
gct gcc gat ggc aag tcg acc cgc tac tgg gac tgt tgc aag ccg tcg Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser	108
1 5 10 15	
tgc tcg tgg ccc ggc aag gcc tcg gtg aac cag ccc gtc ttc gcc tgc Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Asn Gln Pro Val Phe Ala Cys	156
20 25 30	
agc gcc aac ttc cag cgc atc agc gac ccc aac gtc aag tcg ggc tgc Ser Ala Asn Phe Gln Arg Ile Ser Asp Pro Asn Val Lys Ser Gly Cys	204
35 40 45	
gac ggc ggc tcc gcc tac gcc tgc gac cag acc ccc tgg gcc gtc Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val	252
50 55 60	
aac gac aac ttc tcg tac ggc ttc gcc acg tcc atc tcg ggc ggc Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ser Ile Ser Gly Gly	300
65 70 75	
aac gag gcc tcg tgg tgc tgt ggc tgc tac gag tgagtgttcc ccccccccccc Asn Glu Ala Ser Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Glu	353
80 85 90	
cccccccac ccccggttcg gtcccttgcc gtgccttctt catactaacc gcctacccccc	413
tccagg ctg acc ttc acc tcg ggc ccc gtc gct ggc aag acc atg gtt Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val	461
95 100	

gtc cag tcc acc tcg acc ggc ggc gac ctc ggc acc aac cac ttc gac Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Thr Asn His Phe Asp 105 110 115 120	509
ctg gcc atg ccc ggt ggt gtc ggc atc ttc gac ggc tgc tcg ccc Leu Ala Met Pro Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Ser Pro 125 130 135	557
cag ttc ggc ggc ctc gcc ggc gac cgc tac ggc ggc gtc tcg tcg cgc Gln Phe Gly Gly Leu Ala Gly Asp Arg Tyr Gly Val Ser Ser Arg 140 145 150	605
agc cag tgc gac tcg ttc ccc gcc ctc aag ccc ggc tgc tac tgg Ser Gln Cys Asp Ser Phe Pro Ala Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp 155 160 165	653
cgc ttc gac tgg ttc aag aac gcc gac aac ccg acc ttc acc ttc cgc Arg Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Arg 170 175 180	701
cag gtc cag tgc ccg tcg gag ctc gtc gcc cgc acc ggc tgc cgc cgc Gln Val Gln Cys Pro Ser Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg 185 190 195 200	749
aac gac gac ggc aac ttc ccc gtc ttc acc cct ccc tcg ggc ggt cag Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro Val Phe Thr Pro Pro Ser Gly Gly Gln 205 210 215	797
tcc tcc tcg tct tcc tcc agc agc gcc aag ccc acc tcc acc acc tcc Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Lys Pro Thr Ser Thr Ser 220 225 230	845
acc tcg acc acc tcc acc aag gct acc tcc acc acc tcg acc gcc tcc Thr Ser Thr Thr Ser Thr Lys Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ala Ser 235 240 245	893
agc cag acc tcg tcg tcc acc ggc ggc ggc tgc gcc gcc cag cgc tgg Ser Gln Thr Ser Ser Ser Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gln Arg Trp 250 255 260	941
gcg cag tgc ggc ggc atc ggg ttc tcg ggc tgc acc acg tgc gtc agc Ala Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser 265 270 275 280	989
ggc acc acc tgc aac aag cag aac gac tgg tac tcg cag tgc ctt tga Gly Thr Thr Cys Asn Lys Gln Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu 285 290 295	1037

<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer MNC-02

<400> 6
gagcgccaga actgtggatc cacttggta gcaatg 36

<210> 7
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer MNC-03

<400> 7
tccgcgttc tgagcggatc caggcgtttgcg 35

<210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer MKA-05

<400> 8
gccgcccagc aggcggttgc cctcaccacc gagagg 36

<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer MKA-06

<400> 9
tgatcgtcga gtcaggatc cagaatttac aggac 36

<210> 10
<211> 44
<212> DNA

<213> pMKD01

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(25)

<223> non-consecutive bases

<400> 10

gagcgccaga actgtggatc cctctgcctg taagcggatc cagg

44

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> pMKD01

<220>

<221> NON_CONS

<222> (8)..(9)

<223>

<400> 11

Glu Arg Gln Asn Cys Gly Ser Leu Cys Leu
1 5 10

<210> 12

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer pMN-Bam

<400> 12

ggtaaaacaa gtctgtgcgg atcctggac aagatggcca agttcttcct tac

53

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> pJD01

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(25)

<223> non-consecutive bases

<400> 13
tgccggatcct gggacaagat ggccccgttc tgagcggttc cagg

44

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> pJD01

<220>
<221> NON_CONS
<222> (2)..(3)
<223>

<400> 14

Met Ala Pro Phe
1

<210> 15
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer NCE4-Ne

<400> 15
ggggggatcc tgggacaaga tgcgttcctc ccctctc

37

<210> 16
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer NCE4-Ce

<400> 16
ggggggatcc ctgcgttac aggcactgat gg

32

<210> 17
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

出証特2004-3123108

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer NCE4-Ns

<400> 17

ccgggtttgg ccggatccgc tcatggcaag

30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer NCE4-Cs

<400> 18

taaggccctc aaggatccct gcgtctacag

30

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Humicola insolens MN200-1

<400> 19

Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg

1 5

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Humicola insolens MN200-1

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PYRROLIDONE CARBOXYLIC ACID (Pyroglutamic acid)

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (1)..(5)

<223>

<400> 20

Gln Asn Cys Gly Ser Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg

出証特2004-3123108

1

5

10

<210> 21
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer CBn-Stu

<400> 21
gatacatgtat gcgcaggcct tagtcgacta gaatgc 36

<210> 22
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer CBc-Xho

<400> 22
gatcctcaag cttttgctcg agtacacctac aagcac 36

<210> 23
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer CB1-SmSph

<400> 23
ggagggtgca tgccgactga gcccgccag tagcc 35

<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer CB1-Bam

<400> 24
gccgggagag gatccagtgg agg 23

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer CB1-Pst

<400> 25 30
gctcgagtagtac cttactgcag gcactgagag

<210> 26
<211> 66
<212> DNA
<213> pCB1-M2

<400> 26 60
ctagtcgact aaggcctgcg catcatgtat caaaagttgg ccctcatctc ggccttcttg
gctact 66

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> pCB1-M2

<400> 27
Met Tyr Gln Lys Leu Ala Leu Ile Ser Ala Phe Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 28
<211> 61
<212> DNA
<213> pCB1-M2

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(25)
<223> non-consecutive bases

<400> 28 60
gcccgccgcatg cacccagtgc ctgcagtaag gtactcgagc aaaagcttga
g 61

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> pCB1-M2

<220>
<221> NON_CONS
<222> (8)..(9)
<223>

<400> 29

Ala Arg Ala Gln Ser Ala Cys Thr Gln Cys Leu Gln
1 5 10

<210> 30
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer STCE1-TNERV

<400> 30
ggggatatcg cgccatcatgc gttcctcccc cgtcctc

37

<210> 31
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer STCE1-TCET22I

<400> 31
gggatgcatt taaaggcact gcgagttacca gtc

33

<210> 32
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer STCE1-TmNSph

<400> 32

ggggcatgcg atggcaagtc gaccggctac

30

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817

<400> 33

Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg

1 5

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PYRROLIDONE CARBOXYLIC ACID (Pyroglutamic acid)

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (1)..(4)

<223>

<400> 34

Gln Ser Ala Cys Asp Gly Lys Ser Thr Arg

1 5 10

【書類名】要約書

【要約】

【目的】エンドグルカナーゼ活性を有するセルラーゼを界面活性剤存在下で活性の低下が少ないセルラーゼに変換する方法、界面活性剤存在下でエンドグルカナーゼ活性の低下が少ないセルラーゼを提供する。

【構成】エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質のN末端側に、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加したセルラーゼは、その天然型セルラーゼと比較し、界面活性剤存在下でエンドグルカナーゼ活性の低下が抑制された。

【選択図】なし。

特願 2003-409692

出願人履歴情報

識別番号

[000006091]

1. 変更年月日

1990年 8月 3日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区京橋2丁目4番16号

氏 名

明治製菓株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018184

International filing date: 07 December 2004 (07.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-409692
Filing date: 08 December 2003 (08.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 February 2005 (03.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.